

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Prüfung eines Verfahrens zur
**BLAUSÄUREBESTIMMUNG AUS BLUT
UND URIN DURCH MICRODIFFUSION**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Paul Festl
aus Wartenberg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. med. H.-B. Wuermeling

Prüfung eines Verfahrens zur BLAUSÄUREBESTIMMUNG AUS BLUT UND URIN DURCH MICRODIFFUSION

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von

Paul Festl

aus Wartenberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 1. 1980

Meinen Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Blausäure und ihre praktische Anwendung	1
1.2. Toxizität	2
1.3. Giftwirkung	3
1.4. Aufnahme	4
1.5. Stoffwechsel, Ausscheidung	4
1.6. Verteilung	5
2. <u>Bisherige Untersuchungen</u>	6
2.1. Methoden zum Nachweis der Blausäure	6
2.2. Die von uns zu prüfende Methode	10
2.3. Postmortale Blausäureabnahme	11
2.4. Postmortale Cyanidbildung	14
3. <u>Problemstellung</u>	14
4. <u>Eigene Untersuchungen</u>	15
4.1. Grundlage des Verfahrens	15
4.2. Geräte, Chemikalien, Lösungen	16
4.2.1. Geräte	16
4.2.2. Chemikalien	16
4.2.3. Lösungen	17
4.2.4. Herstellung der Reagenzien	17
4.3. Hinweise	18
4.4. Erstellung der Eichkurven	19
4.5. Präzision und Richtigkeit	27
5. <u>Abnahme der Cyanidkonzentration im Urin</u>	28

6.	<u>Abnahme der Cyanidkonzentration im Blut</u>	29
7.	<u>Diskussion</u>	31
8.	<u>Zusammenfassung</u>	32
9.	<u>Literaturverzeichnis</u>	34

1. Einleitung

1.1. Blausäure und ihre praktische Anwendung

Die Blausäure, bzw. ihre Salze, die Cyanide, haben in der menschlichen Geschichte einen bedeutungsvollen Wandel erfahren. Zunächst waren sie als gefürchtete Gifte bekannt, dann, im 18. und 19. Jahrhundert, spielten sie, z.B. in Form des "Kirschchlorbeers" die Rolle eines geschätzten Medikamentes. Heute finden die Blausäure und ihre Derivate in der Schädlingsbekämpfung und in der Industrie, so z.B. zur Großraumdurchgasung, in den Laugereien von Gold und Silbersalzen und in der Galvanotechnik, Verwendung. Eine therapeutische Verwendung haben sie heute nur noch in komplexgebundener Form. Als Mord- und Suizidmittel spielen sie aber immer wieder eine Rolle.

Die Blausäure (HCN , Cyan-Wasserstoff) ist eine schwache und in reiner Form eine sehr leicht flüchtige, bei 26° siedende, farblose, in Wasser lösliche Flüssigkeit. Der sogenannte Bittermandelgeruch der Blausäure wird nicht von jedem Menschen wahrgenommen.

Blausäure kommt in unreinem Leuchtgas, Kokereigas und Gichtgasen vor. Sie entsteht insbesondere bei der Einwirkung von Säuren auf Cyanide, wie Natrium-, Kalium- und Kalziumcyanid, aber auch aus komplexen Cyaniden, wie z.B. Kaliumferriocyanid. Ebenso kann sich Blausäure beim Schwe-

len bestimmter Kunststoffe, wie z.B. Polyacrylnitril, entwickeln. In bitteren Mandeln und vielen Obstkernen, z.B. Pfirsichkernen, auch in Leinsamen und bestimmten tropischen Wurzeln, wie z.B. in der Cassavawurzel, kommen blausäurehaltige Glycoside vor, aus denen enzymatisch Blausäure abgespalten werden kann, so daß schwere, z.T. tödliche Vergiftungen resultieren. So können z.B. von bitteren Mandeln etwa 70 für Erwachsene, 6 - 7 für kleine Kinder tödlich sein (MUELLER 1975).

1.2. Toxizität

Der Mak-Wert 1979 für Blausäure ist auf 10 ppm (11 mg/m^3), für Cyanide, berechnet als HCN, auf 5 mg/m^3 festgesetzt.

Die tödliche Dosis von Natriumcyanid liegt für den Menschen bei 0,05 g und die von Kaliumcyanid um 0,12 g (TEWARI, HARPALANI 1971). Die orale letale Dosis (LD) für Blausäure beträgt nach MUELLER (1975) 1 - 2 mg/Kilogramm, für Natrium- und Kaliumcyanid 2 - 3 mg/Kilogramm für den Erwachsenen. Bei Inhalation können 100 bis 150 ppm HCN über 30 - 60 Minuten, 200 - 500 ppm über wenige Minuten tödlich sein. Bei sehr hoher Konzentration ist der Eintritt des Todes innerhalb weniger Sekunden möglich.

1.3. Giftwirkung

TEWARI und HARPALANI (1971) nehmen an, daß die Giftwirkung der Salze der Blausäure z.T. von der Schnelligkeit abhängt, mit der sie bei ihrer Lösung im Mageninhalt ionisiert werden, d.h. also vom Säuregehalt des Magensaftes und von der Art und Menge des Mageninhaltes. Die Cyanwasserstoffsäure und die Cyanide gelten als überaus giftig. Sie blockieren die Atmung der Gewebe, indem sie die Wirksamkeit der Cytochromoxydase in der Warburg'schen-Atmungskette unterbinden, die bei der Übertragung und Ausnutzung des Sauerstoffs mitwirkt. Dadurch wird der Stoffwechsel jeder Zelle gehemmt. Der mit dem Hämoglobin angebotene Sauerstoff kann in der Zelle nicht mehr verwertet werden und wird dadurch im venösen Blut angereichert. Die Folge ist eine meist hellrote Gesichts- und Hautfarbe der Blausäurevergifteten. Durch die Stoffwechselhemmung kommt es in der Zelle zur Azidose. Die Giftigkeit der Cyanide ist auf den Cyanwasserstoff zurückzuführen, der durch Hydrolyse freigesetzt wird. Sie gelten als extrem schnell wirkende Gifte wegen der außerordentlich kurzen Zeitspanne, in der sie den Tod herbeiführen. Die Vergiftungssymptome sind abhängig von der Giftdosis, in ihrem Zeitverlauf verschieden, aber in ihrer Reihenfolge gleich. Zunächst kommt es durch Erregung des Karotissinus-Reflexes zu einer verstärkten Atmung, danach treten Krämpfe

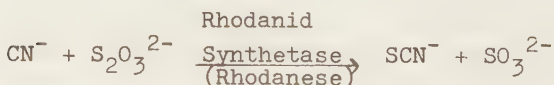
auf, die sich bis zum Opisthotonus steigern. Im Opisthotonus kommt es zum Atemstillstand und kurz danach zum Herzstillstand. Der Atemstillstand kann, je nach Resorptionsgeschwindigkeit, in wenigen Minuten oder in einigen Stunden eintreten (WEGER 1975).

1.4. Aufnahme

Die Aufnahme von gasförmiger Blausäure und blausäureabgebenden Verbindungen erfolgt meist durch Inhalation, von Cyaniden und Glycosiden meist oral. Zu denken ist auch an eine perkutane Aufnahme, insbesondere durch verletzte und verbrannte Haut sowie an eine Injektion (BRETTEL, HIRSCH, RAUDONAT 1968, JANSSEN, BURGER 1968).

1.5. Stoffwechsel, Ausscheidung

Die Resorption von Blausäure über den Respirationstrakt sowie von Blausäure und Cyaniden nach oraler Aufnahme erfolgt rasch. Die Hautresorption kann über Stunden verlaufen (MÜLLER 1975). Die Entgiftung erfolgt in erster Linie durch Umwandlung von Cyanid in das viel weniger toxische Rhodanid (Thiocyanat- SCN^-):



Das für die Entgiftungsreaktion notwendige Thio-sulfat wird hauptsächlich in den Mitochondrien der Leber- und Nierenzellen gebildet. Normalerweise ist aber die zur Verfügung stehende Menge an Thiosulfat so begrenzt, daß nur geringe Cyanidmengen pro Zeiteinheit entgiftet werden (LANG 1933). Möglicherweise wird ein geringer Blausäureanteil zu CO_2 oxidiert (BOXER, RICKARDS 1952).

1.6. Verteilung

Die Blausäureverteilung hängt z.T. vom Aufnahmeweg ab. Bei der inhalatorischen Vergiftung findet man im Mageninhalt kaum Cyanid, dagegen in der Lunge oft erhebliche Mengen. Bei oraler Aufnahme dagegen kann der Magen noch erhebliche Mengen enthalten. UENO und IRIBE (1961) fanden nach oraler Aufnahme mit akuter Vergiftung folgende Organverteilung:

Galle > Leber > Blut > Milz > Lunge > Niere > Herz > Gehirn.

Bei den von BONNICHSEN und MAEHLI (1966) untersuchten 32 oralen Vergiftungen dagegen war der Blutwert im allgemeinen höher als der Leberwert.

2. Bisherige Untersuchungen

2.1. Methoden zum Nachweis von Blausäure

Qualitativer Nachweis von Blausäure

Für die Prüfung auf Blausäure von Körperflüssigkeit, z.B. Mageninhalt, stehen Testpapiermethoden zur Verfügung. Zum Nachweis von Blausäure und Cyaniden in wässriger Lösung und Extrakten liefert die Fa. Macherei, Nagel & Co., Düren ein Cyantesmoindikatorpapier. Es schlägt bei Anwesenheit von Cyanid von blaßgrün nach blau um und reagiert nicht mit alkalischen Cyanidlösungen, dagegen sehr empfindlich in schwach schwefelsauren Lösungen. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,2 ppm HCN = 0,2 mg pro Milliliter. Die Reaktion wird jedoch durch Kaliumhexocyanoferrat II, Kaliumhexocyanoferrat III, Rhodanid, Thiosulfat und freies Chlor gestört.

SCHÖNBEIN (1869) entwickelte eine Methode deren Nachweisgrenze im Mikrogrammbereich liegt. Der Test beruht auf zwei Reaktionsschritten:

1. Cyanid bildet unter Einwirkung von Kupfersulfat eine oxydierende Verbindung,
2. das Reaktionsprodukt von 1 reagiert mit Guajakharz unter Blaufärbung. Der genaue Reaktionsablauf ist nicht bekannt. Die Nachweisgrenze liegt im Mikrogrammbereich. Der Test ist jedoch nicht ganz spezifisch.

Auch Cl_2 , Br_2 , O_3 und NH_3 ergeben eine Blaufärbung. Sulfide können störendes schwarzes Kupfersulfid bilden.

Die seit langem bekannten Bestimmungsmethoden über die Berlinerblau-, Eisenrhodanid-, Pikrinsäure-, Guajakharz-, Silbercyanid-, Jodamylum- und Phenolphthaleinreaktionen weisen folgende Nachweisempfindlichkeiten für Cyanid in Milligramm pro Liter auf:

Tab. 1 Empfindlichkeiten photometrischer
Cyanidbestimmungsmethoden

Bestimmungsmethode	Erfaßbare Cyanid- grenzkonzentration in mg/l
Berlinerblau-Reaktion	2
Eisenrhodanid-Reaktion	0,1
Pkrinsäure-Reaktion	1
Jodamylum-Reaktion	0,1
Guajakharz-Reaktion	0,004 - 0,1
Silbercyanid-Reaktion	0,03 - 1
Phenolphthalein-Reaktion	0,05 - 0,1

Nur die beiden ersten Reaktionen sind für Cyanid spezifisch. Die anderen können eigentlich nur so ausgewertet werden, daß ihr Ausbleiben das Fehlen von Cyanid anzeigt. Äußerst empfind-

lich gegen Störungen ist die Guajakharz-Reaktion, über deren Empfindlichkeit sehr verschiedene Aussagen vorliegen. Sie spricht außer auf Cyanid auch noch auf Chlor, Brom, Jod, Ozon, Ammoniak und sogar Zigarrenrauch an (ASMUS, GARSCHLAGEN 1953).

Die Untersuchung von Atem- und Raumluft wird am einfachsten über die chromometrische Gasanalyse mit Drägerröhrchen durchgeführt.

Quantitativer Nachweis von Blausäure

Für die quantitative Bestimmung von Blausäure wird z.B. die Methode nach GETTLER und GOLDBAUM (1947) empfohlen. Nach Freisetzung aus dem Untersuchungsmaterial durch Zugabe von Schwefelsäure, wird die Blausäure durch ein Testpapier geleitet, das mit Fe-II-Sulfat und NaOH imprägniert ist. Anschließend wird das Papier in HCL gebadet, wobei zusammen mit aus Fe-II gebildeten Fe-III Berliner-Blau entsteht. Die Intensität der Blaufärbung ist ein Maß für die Blausäuremenge. Der Test ist spezifisch für Blausäure, die Nachweisgrenze liegt bei 1 ug.

EPPSTEIN (1947) läßt aus dem Cyanid erst Chlorcyan entstehen und dieses unter Ausnutzung der Zincke-König'schen Reaktion mit Pyridin und

1-Phenyl-3-Methylpyrazolon unter Bildung eines Polymethinfarbstoffes reagieren. Die Methode spricht auf Cyanid und Rhodanid an und besitzt für Cyanid eine Nachweisempfindlichkeit von 0,2 mg pro Liter und ist im Bereich von 0,2 bis 1,2 mg pro Liter anwendbar. Die Farbe ist jedoch nicht haltbar und muß in wenig durchsichtiger und nicht gut reproduzierbarer Weise durch Zusatz von bis- Phenylmethylphyrazon stabilisiert werden.

Eine vollautomatische fluorometrische Bestimmung des Cyanidspiegels im Blut wird von GROFF, CUCINELL, VICARIO und KAMINSKIS (1977) beschrieben. Die Methode arbeitet mit einer Erfassungsgrenze von 0,5 μ g Cyanid/ml. Die Spezifität wird durch Dialyse und Destillation erreicht. Die Präzision beträgt $\pm$ 6,5 % im Konzentrationsbereich zwischen 1,3 und 9,8 μ g Cyanid/ml. Es können 20 Bestimmungen pro Stunde durchgeführt werden.

TEWARI und HARPALANI (1971) trennen das Gift aus Körperflüssigkeiten nach deren Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure und Weinsäure durch Destillation mit Wasserdampf ab. Das Destillat wird in starker Kalilauge gesammelt, um den Cyanwasserstoff zu binden. Das Destillat wird teils für die qualitative, teils für

die quantitative Analyse benutzt. Das Cyanid kann durch den typischen Bittermandelgeruch, durch in Pkrinsäure gefärbtes Untersuchungspapier, durch die Guajak-Kupfersulfat-Testpapier-Methode und durch die Preußischblau-Färbungsreaktion nachgewiesen werden.

DRABNER und SCHWERD (1969) verwenden zur Bestimmung von Blausäure das Spurenreagenz Bathophenathrolin, das mit Cyanidionen unter Bildung eines blauen Farbkomplexes reagiert. Der Komplex ist in Chloroform gelöst über Wochen stabil. Ca. 0,1 µg sind mit dem Reagenz noch erfaßbar. Gemessen wird photometrisch oder nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung.

2.2. Die von uns zu prüfende Methode

Als Grundlage unserer Untersuchungen diene die Arbeit von FELDSTEIN und KLENDSHOJ (1954): Die Bestimmung von Cyanid aus biologischem Material durch Microdiffusion. Mittels Microdiffusion kann man auch noch geringe Mengen vieler flüchtiger Substanzen nachweisen. CONWAY (1957) entwickelte diese Methode für die Bestimmung von Ammonium, Alkohol, Kohlendioxid, Aminen und Kohlenmonoxid. Diese Methode hat sich besonders gut zur Abtrennung von flüchti-

gen Giften aus biologischem Material bewährt. Wir untersuchten die Bestimmung von Blausäure aus Blut und Urin durch Mikrodifffusion.

Die colorimetrische Bestimmung des durch Mikrodifffusion in Freiheit gesetzten und in NaOH absorbierten Cyanids geht auf das Verfahren von BOXER und RICKARDS (1951) zurück. Sie untersuchten den Nachweis von Cyanid in Plasma, Serum, Urin, Magensaft und Speichel. Die Methode ist spezifisch für Cyanid und ca. 85 % können nachgewiesen werden.

Die geringste Menge von Cyanid, die FELDSTEIN und KLENDSHOJ (1954) mit dieser Methode nachweisen konnten, waren 2,5 mg/100 Milliliter.

2.3. Postmortale Blausäureabnahme

Erfahrungsgemäß nimmt die Menge des in dem Untersuchungsmaterial vorhandenen Cyanid mit der Länge der seit der Entnahme bzw. seit dem Tod verfloßenen Zeit ab. TEWARI und HARPALANI (1971) nehmen an, daß die Abnahme auf die Flüchtigkeit des Giftes, auf seine Umsetzung in ameisensaures Ammonium infolge von Hydrolyse, sowie auf die Bildung von Cyanhydrinen und Thiocyanaten zurückzuführen sein dürfte. BALLANTYNE, BRIGHT und WILLIAMS (1973, 1974) injizierten 36 Kaninchen Cyanid intramuskulär.

Die Kaninchen wurden in zwei gleiche Gruppen von je 18 Kaninchen geteilt. Bei der ersten Gruppe wurden sofort nach Eintreten des Todes Proben von Blut, Lunge, Niere, Leber und Gehirn entnommen. Das Blut wurde heparinisiert und ebenso wie die anderen Organe in abgedichteten Gefäßen bei 10 bis 15° C bis zu 3 Wochen aufgehoben und in regelmäßigen Abständen untersucht, und zwar die erste Probe sofort, die anderen nach ein, zwei, drei, sieben, vierzehn und einundzwanzig Tagen. Bei der zweiten Gruppe wurden die Organe in situ belassen und der Cyanidgehalt in den gleichen Abständen wie bei Gruppe eins gemessen. Es wurden jeweils 3 Tiere pro Messung und Gruppe untersucht. Die Autoren fanden in beiden Gruppen folgende Organverteilung:

Blut > Lunge > Gehirn > Niere > Leber.

Die höchste Konzentration fand sich im Blut, doch waren auch in Lunge und Gehirn erhebliche Mengen zu finden. Nach 24 Stunden waren in Leber und Niere nur noch Spuren von Cyanid in beiden Gruppen nachzuweisen. Beim Blut der Gruppe eins konnten selbst nach 21 Tagen noch 40 % der Ausgangswerte gefunden werden. Beim Blut der Gruppe zwei waren dagegen nach 3 Tagen nur noch 30 % zu finden. Bei den Organen waren die Ergebnisse noch schlechter.

Auch TEWARI und HARPALANI (1971) stellten fest, daß im Verlauf längerer Zeiträume eine regelmäßige Abnahme der in Körpergeweben vorhandenen Cyanidmengen erfolgt und zwar infolge der Umwandlung des Cyanids in Thiocyanat. Die Autoren gaben zu 50 g Körpergewebe 87 mg Cyankali. Nach 180 Tagen konnten sie nur noch 1,02 mg nachweisen.

Je nach den Umständen ist auch an die Möglichkeit der Entstehung und Aufnahme von Blausäure bei Bränden, unter Beteiligung stickstoffhaltiger Materialien, zu denken. WETHERELL (1966) konnte in Blutproben von 53 Brandleichen in 39 Fällen Cyanid nachweisen. Der Cyanidblutspiegel betrug bis 220 mg pro 100 ml.

BOGUSZ (1976) konnte nach tödlicher Cyanidvergiftung nur in Blut und Kolon Cyanid nachweisen.

Die Cyanidkonzentration im Urin ist im Vergleich zu derjenigen des Blutes gering. SANDBERG (1967) berichtet z.B. bei einer chronischen Blausäurevergiftung beim Menschen über Blutwerte von 10 bis 12 mg pro 100 ml gegenüber Urinwerten von 2 mg pro 100 ml. DE LEENHEER (1969) fand bei einer tödlichen Vergiftung im Blut 9,1 mg pro 100 ml, im Urin 2,4 mg pro 100 ml (berechnet als KCN). Bei perkutanen, tödlichen Blausäurevergiftungen wird im Urin kaum Cyanid gefunden.

2.4. Postmortale Cyanidbildung

Außerdem ist an eine postmortale Cyanidbildung zu denken. Besondere Probleme bringt die Tatsache, daß bei Lagerung von Blut- und Organproben einerseits der ursprünglich vorhandene Cyanidgehalt sehr rasch abnehmen kann, auf der anderen Seite aber besonders bei + 4°C, vielleicht durch Bakterieneinwirkung, eine Cyanidneubildung festgestellt wurde. BERNT, KERDE und PROKOP (1961), CURRY, PRICE, RUTHER (1967) stellten fest, daß die Cyanwasserstoffzunahme im Magen und Blut einige Tage post mortem 100 - 800 ug/100 g in anderen Organen 1 ug/100 g Gewebe betragen kann. Deshalb sollte die Untersuchung immer so schnell wie möglich erfolgen.

3. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit prüften wir die Brauchbarkeit der von FELDSTEIN und KLENDSHOJ (1954) beschriebenen Methode zur quantitativen Bestimmung von Blausäure aus biologischem Material mittels moderner Kriterien, nämlich Präzision, Richtigkeit und Praktikabilität. Weiter sollte die Abnahme der Cyanidkonzentration nach Lagerung der Proben in Urin und Blut über 78 Stunden überprüft werden.

4. Eigene Untersuchungen

Optische Cyanidbestimmungsmethoden gibt es schon seit langer Zeit, doch es besteht nach wie vor das Bedürfnis nach einer Methode, die sowohl eine hohe Empfindlichkeit besitzt, als auch spezifisch für Blausäure ist.

4.1. Grundlage des Verfahrens

Als Arbeitsvorschrift diene uns die von FELDSTEIN und KLENDSHOJ (1954) beschriebene Methode. Die Cyanid-Konzentration im Blut und Urin wird nach Mikrodifffusion in Conway-Schälchen bestimmt. Dies geschieht durch Absorption der durch Säure in Freiheit gesetzten Blausäure an 0,1 n NaOH und anschließende Messung der Blauviolett-färbung im Spektrophotometer. Das Extinktionsmaximum liegt bei $586 \text{ nm} \pm 2$. Der Einfluß von in Wasser gelösten Begleitstoffen wurde von ASMUS und GARSCHLAGEN (1953) eingehend untersucht. Es zeigt sich, daß Chlorid-, Borat-, Nitrat-, Nitrit-, Phosphat-, Oxalat-, Tartrat-, Acetat-, Hydrogencarbonat- und Sulfat-Ionen sowie Phenole auch in Konzentrationen von 1 000 mg/l nicht störend wirken. Größere Mengen an Sulfiden müssen vorher mit Cadmiumnitrat entfernt werden. Natriumsulfit und Eisen (III) stören, wenn die Konzentration etwa 20 mg/l übersteigt.

4.2. Geräte, Chemikalien, Lösungen

4.2.1. Geräte

Shimadzu Double Beam Spektrophotometer UV 2000

Spaltbreite 1 nm

Auflösungsverhältnis $F = 0,001$ bei 586 nm

Conway-Schälchen

Schliffreagenzgläser

O/S Normal-Küvetten mit 10 mm Schichttiefe

Meßkolben

Enzymtestpipetten

4.2.2. Chemikalien

Barbitursäure, unsubstituiert 99 % zur Synthese

$C_4H_4N_2O_3$ MG: 128,09

Merck-Schuchardt Nr. 899 133

Natriumdihydrogenphosphat p.a.

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ MG: 137,99

Merck-Nr. 6346

Chloramin-T (Trihydrat) p.a.

$C_7H_7Cl \cdot NaO_2S \cdot 3H_2O$ MG: 281, 96

Merck-Nr. 2426

Kaliumcyanid p.a.

KCN MG: 65,12

Merck-Nr. 4967

Pyridin p.a.

C_5H_5N

Merck-Nr. 9728

4.2.3. Lösungen

H_2SO_4 10 %

0,1 n NaOH

Konzentrierte HCL p.a.

4.2.4. Herstellung der Reagenzien

Für die Chloramin-T-Lösung wurden 0,25 g Chloramin-T · $3H_2O$ mit aqua-dest. auf 100 ml gelöst.

Das Barbitursäurereagenz wurde in einem 50 ml Kolben wie folgt hergestellt:

3 g Barbitursäure wurden in einem 50 ml Meßkolben eingewogen und mit 25 ml aqua-dest. 30 Minuten auf dem Schüttler maschinell geschüttelt. Dann gibt man 15 ml Pyridin hinzu und schüttelt die Lösung wieder 15 Minuten gut durch bis die ganze Barbitursäure gelöst ist. Man fügt dann 3 ml konzentrierte HCL im Schuß zu und füllt nach Temperatúrausgleich mit aqua-dest. auf 25 ml auf. Die Lösung muß farblos sein.

Der Phosphat-Puffer wurde unter Einwaage von 13,8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ad 100 ml aqua-dest. hergestellt. Der pH-Wert betrug 4.

Die KCN-Stammlösung wurde wie folgt hergestellt:

Zunächst wurden 3,75 g KCN p.a. in 1000 ml 0,1 n NaOH gelöst. Um die Stammlösung mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ g CN^- /ml zu erhalten, wurde 1 ml der oben hergestellten Lösung in 500 ml 0,1 n NaOH gelöst. Aus der Stammlösung wurden durch Verdünnung mit Blut oder Urin bzw. 0,1 n NaOH Cyanidkonzentrationen zwischen 0,04 μg CN^- /ml bis 0,38 μg CN^- /ml hergestellt.

4.3. Hinweise

Die Chloramin-T-Lösung und das Barbitursäurereagenz müssen täglich neu hergestellt werden. Das Pyridin muß im dunklen Raum aufbewahrt werden.

Es empfiehlt sich, die 0,1 normale NaOH ab und zu gesondert zu messen, da sie eventuell in der Raumluft vorhandenes Cyanid aufnimmt. Dies geschieht in gleicher Weise wie die analytische Bestimmung von Blausäure aus Blut und Urin, jedoch wird statt Blut bzw. Urin die zu messende 0,1 n NaOH verwendet.

Für die Reagenzien wird eine neu angemischte und garantiert reine 0,1 n NaOH verwendet. Die Barbitursäure und das Chloramin-T sollten im Exsikkator aufbewahrt werden.

Sämtliche Chemikalien und Lösungen müssen p.a.-Qualität besitzen.

4.4. Erstellung der Eichkurven

Eichkurve für Cyanid in 0,1 n NaOH

Eine entsprechende Menge der Cyanid-Stammlösung wird in die äußere Kammer des Conway-Schälchens pipettiert. Dazu gibt man 1 ml 10 %-ige H_2SO_4 . In die innere Kammer des Conway-Schälchens gibt man 2 ml 0,1 n NaOH, welche das freigesetzte Cyanid der äußeren Kammer absorbiert.

Der äußere Rand des Conwayschälchens und der Deckel werden mit Vaseline eingeschmiert. Der Inhalt der äußeren Kammer wird gut durchmischt und das Schälchen sofort gut luftdicht verschlossen. Den Ansatz läßt man bei Raumtemperatur 3 Stunden stehen.

Farbreaktion

Nach 3 Stunden Inkubationszeit wird die das Cyanid enthaltende NaOH in der Mitte des Schälchens gut durchmischt und je 0,5 ml davon werden für den Meßansatz verwendet und in Schliffreagenzgläser pipettiert.

Dazu kommen 0,5 ml 0,1 n NaOH und 2 ml NaH_2PO_4 -Lösung. Nun gibt man 1 ml 0,25 %-ige Chloramin-T-Lösung dazu und mischt den Ansatz gut durch. Nach frühestens 2 Minuten, aber höchstens 20 Minuten, werden 3 ml des Pyridinbarbitursäure-reagenzes zugegeben. Der Ansatz wird wieder gut

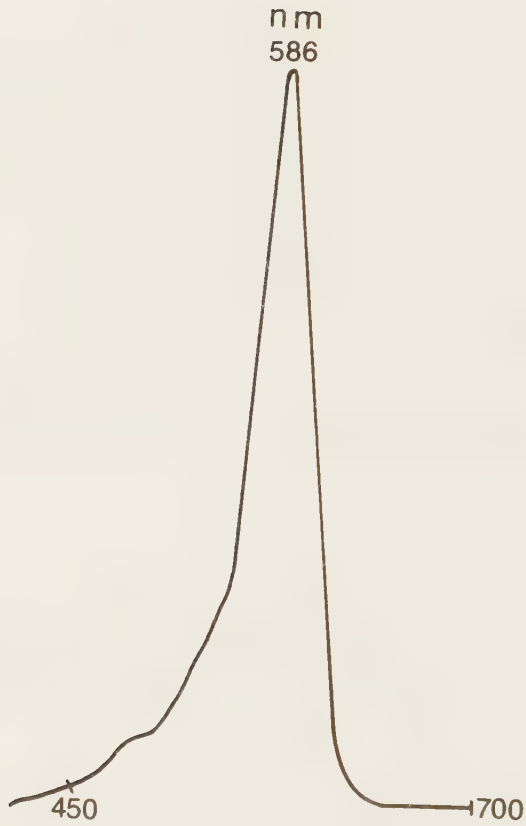


Abb. 1 Absorptionskurve der Farblösung
Extinktionsmaximum bei 586 nm

durchmischt. Gemessen wird bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von 586 nm (Abb. 1) gegen einen Reagenzienleerwert, welcher anstelle der Absorptionsflüssigkeit 0,1 n NaOH enthält. Das Extinktionsmaximum wird ca. 3 Minuten nach Zugabe des Barbitursäurereagenzes erreicht.

Leerwert

Um eine Blaufärbungsreaktion im Leerwert zu verhindern, soll anders wie in der vorliegenden Arbeit von FELDSTEIN und KLENDSHOJ (1954) im Leerwert zuerst das Barbitursäurereagenz und dann erst die Chloramin-T-Lösung pipettiert werden.

Tabelle 2 gibt die Abhängigkeit der Extinktion von der in das Conwayschälchen gegebenen Cyanidmenge an. Aus diesen Werten wurde die in Abb. 2 aufgetragene Eichkurve ermittelt.

Tab. 2 Extinktion in Abhängigkeit der Cyanidkonzentration

ug CN ⁻ /ml Probe	Extinktion*
0,04	0,18
0,06	0,295
0,08	0,33
0,12	0,51
0,15	0,56
0,2	0,82
0,24	0,96
0,29	1,10
0,33	1,20
0,38	1,56

*Mittelwerte aus je 10 Bestimmungen

Die Extinktion der nach der Analysenvorschrift behandelten verdünnten Cyanidlösung wurde mit dem Shimadzu Double Beam Spektrophotometer gemessen und in Abb. 2 und 3 graphisch gegen die Konzentration aufgetragen. Das Lambert-Beer'sche-Gesetz war im ganzen untersuchten Bereich streng erfüllt. Trotz der Gültigkeit des Lambert-Beer'schen-Gesetzes im geprüften Bereich kann im Gebiet höherer Konzentration eine Extinktionsmessung nicht mehr durchgeführt werden, da hier die Eichkurve nicht mehr linear verläuft. Die in der Vorschrift angegebenen Arbeitsbedingungen müssen genau eingehalten werden.



Abb. 2 Eichkurve für Cyanid in 0,1 n NaOH

Es ist selbstverständlich, daß alle Pipetten, Conwayschälchen, Reagenzgläser und Meßküvetten äußerst sauber gereinigt sind. Wir verwendeten Extran, spülten anschließend die Gläser mit demineralisiertem Wasser und Aceton und trockneten die Gläser in Heißluft.

Eichkurve für Cyanid in Blut und Urin

Eine entsprechende Menge der Cyanid-Stammlösung wird in einem 10 ml Meßkolben pipettiert und mit Blut bzw. Urin auf 10 ml aufgefüllt.

Probenahme

Für unsere Versuche verwendeten wir Blut und Urin von Nichtraucher.

Das Blut wurde mit Heparin-Monoretten entnommen, um Gerinnung zu verhindern (Sarstett 10 ml).

In die äußere Kammer des Conwayschälchens gibt man 1 ml 10 %-ige H_2SO_4 und 2 ml Blut bzw. Urin, welche wie oben angegeben, mit einer entsprechenden Menge Cyanid versetzt ist. Die innere Kammer des Conwayschälchens enthält 2 ml 0,1 n NaOH, welche das freigesetzte Cyanid der äußeren Kammer absorbiert. Das Conwayschälchen wird wieder luftdicht verschlossen, der Ansatz gut

durchmischt und nach 3 Stunden Inkubationszeit wird das mit Cyanid angereicherte NaOH-Adsorbens für die Messung verwendet. Die Messung des Cyanidgehaltes geschieht in gleicher Weise wie bereits bei der Erstellung der Eichkurve beschrieben.

Tabelle 3 gibt die Extinktion in Abhängigkeit der Cyanidkonzentration in Blut und Urin an. Je Konzentration wurden 10 Ansätze gemessen.

Tab. 3 Extinktion in Abhängigkeit von der Cyanidkonzentration in Blut und Urin

Konzentration $\mu\text{g CN}^-/\text{ml}$ Blut bzw. Urin	Extinktion*	
	Urin	Blut
0,04	0,15	0,17
0,06	0,24	0,25
0,08	0,31	0,31
0,12	0,44	0,47
0,15	0,48	0,52
0,16	0,59	0,60
0,2	0,73	0,77
0,24	0,88	0,88
0,29	0,99	0,95
0,33	1,13	1,10
0,35	1,15	1,15
0,38	1,21	1,18

* Mittelwert aus je 10 Bestimmungen

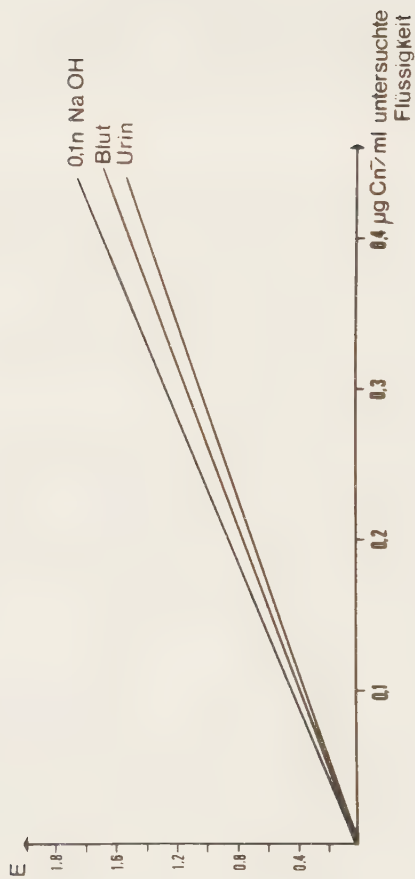


Abb. 3 Eichkurve für die Cyanidbestimmung in
0,1 n NaOH Blut und Urin

Aus den in Tabelle 3 ermittelten Werten wurden die Eichkurven für Blut und Urin errechnet und gemeinsam mit der Eichkurve für die 0,1 n NaOH in Abbildung 3 aufgetragen.

4.5. Präzision und Richtigkeit

Die mittlere Standardabweichung betrug für Cyanid in 0,1 n NaOH $\pm 5,56 \%$, bei Urin $\pm 12,16 \%$ und bei Blut $\pm 2,75 \%$. Der Konzentrationsbereich in dem gemessen wurde lag zwischen 0,04 μg und 0,38 $\mu\text{g/ml}$ untersuchtes Probematerial. Es wurden je Konzentration 10 Ansätze gemessen.

Die Standardabweichung wurde wie folgt berechnet:

$$S_X = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

Die Richtigkeit der Methode wurde über die Wiederfindungsrate ermittelt. Sie beträgt bei Blut 91,84 % und bei Urin 87,6 %, verglichen mit den Werten für Cyanid in 0,1 n NaOH, siehe Abb. 3.

Die Konzentration der Standardlösungen wurden 14-tägig überprüft. Die Konzentrationen blieben über die Dauer der Versuche - 5 Monate - stabil.

5. Abnahme der Cyanidkonzentration im Urin

Wir stellten fest, daß die Wiederfindungsrate, wie oben bereits angegeben, bei Durchführung der Analyse sofort nach dem Cyanidzusatz bei 87,64 % lag. Wurden die Proben nicht sofort gemessen, sondern erst nach einigen Stunden, so war die Wiederfindungsrate geringer. Wir haben deshalb die Abnahme der Cyanidkonzentration über 24 Stunden gemessen. Je Versuch wurden 10 Ansätze im Konzentrationsbereich von 0,2 µg Cyanid pro ml Urin gemessen. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 4 und Abb. 4 ersichtlich.

Tab. 4 Verbleibende CN^- -Konzentration in Urin
in % der Ausgangsmenge (0,2 µg/ml)

Zeit (Std.)	0	1	2	3	6	10	20	24
Wiedergefundene Cyanidmenge im Urin %	100	89	87	80	71	65	56	53

Es zeigt sich also, daß nach 3 Stunden nur noch 80 % der Ausgangsmenge und nach 24 Stunden 53 % der Ausgangsmenge gefunden werden.

Wir versuchten deshalb die Cyanidkonzentration im Urin zu stabilisieren.

Bei Zugabe von Fluorid sank die Extinktion, so daß trotz sofortiger Messung nur noch 43 % der Ausgangskonzentration festzustellen waren.

Außerdem versuchten wir durch Zugabe von NaOH die Cyanidkonzentration im Urin zu stabilisieren. Hier konnten jedoch selbst bei sofortiger Messung nur noch 50% der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden.

6. Abnahme der Cyanidkonzentration im Blut

Um die Abnahme der Cyanidkonzentration im Blut zu überprüfen, wählten wir eine Konzentration von $0,2 \mu\text{g}$ Cyanid pro ml Blut. Gemessen wurde sofort und nach 1, 2, 3, 6, 10, 24, 78 Stunden.

Das Blut wurde mit Heparinspritzen entnommen um Gerinnung zu verhindern. Eine berechnete Menge der Cyanidstammlösung wurde in einen 10 ml Meßkolben gegeben und mit Blut aufgefüllt. Das mit Cyanid versetzte Blut wurde über die oben angegebene Zeit bei Raumtemperatur gelagert. Je Versuch wurden 10 Ansätze gemessen. Die Ergebnisse sind aus Tab. 5 und Abb. 4 ersichtlich.



Abb. 4 Abnahme der CN^- -Konzentration innerhalb 24 Stunden

Tab. 5 Verbleibende CN^- -Konzentration in Blut
in % der Ausgangsmenge (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Zeit (Std.)	0	1	2	3	6	10	20	24	78
Wiedergefun- dene Cyanid- menge in Blut %	100	100	100	100	98	85	89	87	72

Es zeigt sich, daß bei Blut nach 3 Stunden noch 100 % der Ausgangskonzentration nachzuweisen sind. Die Wiederfindungsrate ist selbst nach 24 Stunden mit 87 % der Ausgangskonzentration noch hoch. Nach 78 Stunden beträgt die Wiederfindungsrate nur noch 72 %.

7. Diskussion

Die vorliegende Methode zur Blausäurebestimmung aus Blut und Urin zeichnet sich im Konzentrationsbereich von 0,04 μg pro ml bis 0,38 μg pro ml Blut durch große Genauigkeit aus.

Die Standardabweichung beträgt bei Blut $\pm 2,75$ % und bei Urin $\pm 12,16$ %.

Es ist darauf zu achten, daß die Chloramin-T-Lösung und das Pyridinbarbitursäurereagenz

täglich frisch hergestellt und die verwendeten Materialien p.a.-Qualität besitzen. Vor allem soll die 0,1 normale NaOH wöchentlich auf ihren Cyanidgehalt gemessen werden, da sie eventuell in der Raumluft vorhandenes Cyanid aufnimmt. Die Wiederfindungsrate von 91,84 % bei Blut und 87,6 % bei Urin ist hoch. Doch dürfte die Bestimmung der Ausgangskonzentration aus Urin problematisch sein, da nach 24 Stunden nur noch 53 % nachzuweisen sind. Das Cyanid wird möglicherweise in Thiocyanat umgewandelt. Es ist daher notwendig die Proben möglichst schnell im Labor zu untersuchen. Ein großer Nachteil liegt im Zeitaufwand der Methode, der vorwiegend durch die Diffusionszeit bedingt ist, aber auch durch die Notwendigkeit die oben angegebenen Lösungen frisch herzustellen.

Es wird die Aufgabe nachfolgender Untersuchungen sein, die Dauer zu verkürzen - z.B. durch Austreiben der Blausäure vom Probematerial im Brutschrank - und die Ursache für die Abnahme der Cyanidkonzentration im Urin zu klären.

8. Zusammenfassung

Das von FELDSTEIN und KLENDSHOJ (1954) angegebene Verfahren zur Cyanidbestimmung ist eine gute Methode für die Bestimmung von Cyanid aus

biologischem Material. Die Methode basiert auf der Diffusion von durch Säure aus der zu untersuchenden Probe freigesetztem Cyanid aus der äußeren Kammer eines Conwayschälchens in die innere Kammer, wo das Cyanid an NaOH gebunden wird. Anschließend wird die photometrische Bestimmung der Cyanidkonzentration durchgeführt. Die Methode hat im Konzentrationsbereich von $0,04 \mu\text{g pro ml}$ bis $0,38 \mu\text{g pro ml}$ Probematerial eine Präzision in der Serie von 12,16 % bei Urin und 2,75 % bei Blut bei einer Richtigkeit von 87,6 % bei Urin und 91,84 % bei Blut.

Literaturverzeichnis

ASMUS, E. und GARSCHLAGEN, H.

Über die Verwendung der Barbitursäure für
die photometrische Bestimmung von Cyanid
und Rhodanid

Z. anal. Chem. 138, 414 (1953)

BALLANTYNE, B., BRIGHT J.E. and WILLIAMS P.

An Experimental Assessment of Decreases
in Measurable Cyanide Levels in Biological
Fluids

J. Forens. Sci. 13, 111 (1973)

BALLANTYNE, B., BRIGHT J.E. and WILLIAMS P.

The Post-Mortem Rate of Transformation
of Cyanide

J. Forens. Sci. 3, 71 (1974)

BERNT, A., KERDE, C. and PROKOP O.

Zur Frage der Verwendbarkeit von Cyanid-
befunden im Leichenmaterial

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 51, 522
(1961)

BOGUSZ, M.

Disappearance of Cyanid in Blood and Tis-
sues after Fatal Poisoning

J. Forens. Sci. 7, 173 (1976)

BONNICHSEN, R. and MAEHLI, A.C.

Poisoning by Volatile Compounds

III. Hydrocyanic Acid

J. Forens. Sci 11, 516 (1966)

BOXER, G.E. and RICKARDS, J.C.

Chemical Determination of Vitamin B₁₂

II. The Quantitative Isolation and Colometric Determination of Millimicrogram Quantities of Cyanide

Arch. Biochem. 30, 372 (1951)

BOXER, G.E. and RICKARDS, J.C.

Determination of Thiocyanate in Body Fluids

Archives of Biochemistry and Biophysics
39, 292 (1952)

BRETTEL, H.F., HIRSCH, H.H., RAUDONAT, W.H.

Beobachtungen bei einer mit Kobaltchelate behandelten percutanen Cyanidvergiftung

Hefte Unfallheilk. 94, 301 (1968)

CONWAY, E.J.

Microdiffusion Analysis and Volumetric Error 4. Ed.

Crosby Lockwood and Son LTD (1957)

- CURRY, A.S., PRICE, D.E., RUTTER, E.R.
The Production of Cyanide in Post mortem
Material
Acta pharmacol. et toxicol. 25, 339 (1967)
- DRABNER, J. und SCHWERD, W.
Nachweis von Cyanid in Körperflüssigkeiten
Beitr. gerichtl. Med. 25, 320 (1969)
- EPPSTEIN, J.
Estimation of microquantities of Cyanid
Anal. chem. 19, 272 (1947)
- FELDSTEIN, M. and KLENDSHOJ, N.C.
The Determination of Volatile Substances
by Microdiffusion Analysis
J. Forens. Sci. 2, 39 (1957)
- FELDSTEIN, M. and KLENDSHOJ, N.C.
The Determination of Cyanide in Biologic
Fluids by Microdiffusion Analysis
J. Lab. & Clin. Med. 44, 166 (1954)
- GETTLER, A.O. and GOLDBAUM, L.
Detection and Extimation of Microquantities
of Cyanid
Anal. Chem. 19, 270 (1947)

GROFF, W.A., CUCINELL, S.A., VICARIO, P.,
KAMINSKIS, A.

Eine vollautomatische fluorometrische Be-
stimmung des Cyanidspiegels im Blut
Clin. Toxicol. 11, 159 (1977)

JANSSEN, W., BURGER, E.

Ungewöhnliche Art einer tödlichen Vergif-
tung durch Kaliumcyanid mit außergewöhn-
lichem Organbefund
Arch. Kriminol. 141, 99 (1968)

LANG, K.

Die Rhodanbildung im Tierkörper
Biochem. Ztschr. 259, 243 (1933)

MAEHLY, A.C., SWENSSON, A.

Cyanide and Thiocyanate Levels in Blood
and Urine of Workers with low-grade Ex-
posure to Cyanide
Int. Arch. Arbeitsmed. 27, 195 (1970)

MUELLER, B.

Gerichtliche Medizin
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New
York, Bd. 2, 836 (1975)

SANDBERG, C.G.

A Case of Chronic Poisoning with Potas-
sium Cyanide?
Acta Medica Scandinavica 181, 233 (1967)

SCHÖNBEIN, C.F.

Ueber den thätigen Zustand der Hälfte des
in dem Kupferoxyd enthaltenen Sauerstoffs
und ein darauf beruhendes höchst empfind-
liches Reagens auf die Blausäure und die
löslichen Cyanmetalle
Neuer Repertorium der Pharm. 18, 356
(1869)

TEWARI, S.N. and HARPALANI, S.P.

Eine neue Nachweismethode für Mikromengen
von Cyaniden aus ihren Metaboliten in ver-
westen menschlichen Körpergeweben und ih-
re Anwendung bei forensischen Untersuchen-
gen
Arch. Kriminol. 147, 22 (1971)

UENO, T. and IRIBE, K.

A Study of Autopsy Cases in Tokyo
Report IV. Cyanide Poisoning
Nikon Univ. J. Med. 3, 275 (1961)

WEGER, N.

Cyanidvergiftung und Therapie
Wehrmedizinische Mschr. 1, 6 (1975)

WETHERELL, H.R.

The Occurrence of Cyanide in the Blood of
Fire Victims
J. Forens. Sci. 11, 167 (1966)

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling
(Vorstand des Institutes für Rechts-
medizin der Friedrich-Alexander-Uni-
versität Erlangen-Nürnberg) danke ich
für die Arbeitsmöglichkeit an seinem
Institut und für die freundliche
Übernahme des Coreferates.

Meinen besten Dank darf ich Frau Pro-
fessor Dr. med. Dr. phil. nat. M.
Geldmacher - v. Mallinckrodt, für die
Anregung zur Arbeit, für ihr stetes
Interesse am Fortgang und die hilf-
reiche Beratung zu Fragen dieser Ar-
beit aussprechen.

Lebenslauf

- 02.07.50 Geboren in Wartenberg/Obb. als zweites von zwei Kindern.
Vater: Georg Festl, + 21.6.1951
Mutter: Aloisia Zrieschling,
verw. Festl, geb. Rengsberger.
- 1956 - 1960 Besuch der Volksschule in Wartenberg.
- 1960 - 1965 Besuch des Gymnasiums.
- 1965 - 1969 Lehre als Zahntechniker.
- März 1969 Gesellenprüfung.
- Sept.1968 - Besuch des Abendgymnasiums-
Juni 1972 Regensburg mit Abitur.
- Okt. 1972 - Studium der Zahnheilkunde in
Juni 1978 Erlangen.
- 15.02.1974 Vorphysikum in Erlangen.
- 29.07.1975 Physikum in Erlangen.
- 13.06.1978 Staatsexamen.
- 19.06.1978 Bestallung als Zahnarzt.
- 1.07.1978 Seit diesem Zeitpunkt als Assistenz Zahnarzt in der Zahn-, Mund- und Kieferklinik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg tätig.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197